



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2000245451 A**(43) Date of publication of application: **12 . 09 . 00**

(51) Int. Cl.

**C12N 5/06  
A61P 35/00  
A61K 35/14  
A61K 48/00  
C12N 5/10**(21) Application number: **11059336**(22) Date of filing: **05 . 03 . 99**(71) Applicant: **KAWASHIMA SHOJI  
KK TESHIGAWARA  
KEISUKE OKUBO YUJI**(72) Inventor: **TESHIGAWARA KEISUKE  
OKUBO YUJI****(54) EXTRACORPOREAL CULTURE OF  
LYMPHOCYTE AND CANCER- TREATING  
MEDICINE**

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for an extracorporeal culture of lymphocytes and to obtain a cancer-treating medicine effective to end stage cancer patient for whom conventional cancer-treating methods or medicines do not exhibit any efficacy.

**SOLUTION:** This method for an extracorporeal culture of lymphocytes is provided by culturing lymphocytes

directly after the separation from a peripheral blood in the co-existence of cells obtained by transducing B7 gene into cancer cells and expressing, or lymphocytes activated by a material for activating immuno-activity capable of making the cancer cells as easily injured in the coexistence of cells obtained by transducing B7 gene into cancer cells and expressing to propagate lymphocyte group consisting mainly of NK cells and CD positive T cells. Further, the cancer-treating medicine is obtained by using the lymphocyte group obtained by the methods, as a main agent.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-245451

(P2000-245451A)

(43) 公開日 平成12年9月12日 (2000.9.12)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N 5/06

C 1 2 N 5/00

E 4 B 0 6 5

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 31/00

6 3 5

4 C 0 8 4

A 6 1 K 35/14

35/14

4 C 0 8 7

48/00

48/00

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/00

B

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平11-59336

(71) 出願人 596078382

カワシマ商事株式会社

(22) 出願日

平成11年3月5日 (1999.3.5)

岡山県津山市平福572番地の2

(71) 出願人 599031168

勅使河原 計介

京都府京都市左京区松ヶ崎泉川町20-4

(71) 出願人 597173749

大久保 祐司

京都府京都市下京区五条通柳馬場東入塩竈

町384 ルネ河原町403

(74) 代理人 100075960

弁理士 森 廣三郎

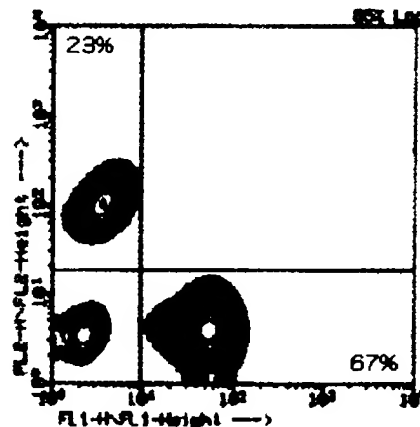
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リンパ球細胞の体外培養法及びガン治療薬

(57) 【要約】

【課題】 従来のガン治療法や治療薬では効果のないガン末期患者に対しても有効な、リンパ球細胞の体外培養法及びそれから得られるガン治療薬の提供を目的とする

【解決手段】 末梢血から分離直後のリンパ球と、ガン細胞にB7遺伝子を導入・発現させたものを、共存させて培養するか、あるいは、ガン細胞の傷害を容易にする免疫能の賦活物質で活性化したリンパ球と、ガン細胞にB7遺伝子を導入・発現させたものを、共存させて培養し、主にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を増殖させるリンパ球細胞の体外培養法であり、更にこれらの方で培養して得られたリンパ球細胞集団を主剤とするガン治療薬である



左上の分画は CD4 陽性 T 細胞

右下の分画は CD16 陽性 NK 細胞

左下の分画は CD16 陰性 NK 細胞と樹状細胞

【請求項1】末梢血から分離直後のリンパ球と、がん細胞にB7遺伝子を導入・発現させたものを、共存させて培養し、更にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を増殖させることを特徴とするリンパ球細胞の体外培養法

【請求項2】 ガン細胞の傷害を容易にする免疫能力賦活物質で活性化したリンパ球と、ガン細胞にB7遺伝子を導入・発現させたものを、共存させて培養し、主にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を増殖させることを特徴とするリンパ球細胞の体外培養法。

【請求項3】 請求項1又は2記載の培養方法で増殖・培養した主にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を主剤とするがん治療薬

【 ( ) ( ) ( ) 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なリンパ球の増殖・培養方法及び増殖・培養したリンパ球を使用した新規なガン治療薬に関するもので、従来のガン治療が無効なガ：患者に対しての新しい治療薬を提供するものである。

【従来の技術】従来の主にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を体外環境下で単独で長期間培養するには、EBウイルスによって変異させたB細胞に放射線を当てて増殖を抑えたものを主にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団の維持に必要な物質を産生する細胞として使用し、主にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団の培養維持に務めてきた。この方法は公知である。

【0003】しかしながら、この方法には、発ガンに関わるウイルスとして知られているEBウイルスを使用しなければならず、この上にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を使用して治療を行うということは、副作用などに関して大きな問題があった。また、変異させたB細胞の能力にも大きなばらつきがあったため、安定的な培養を行う事が難しかった。

【発明が解決しようとする課題】本発明は、従来の主にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団の培養法とはまったく異なったアプローチで、安全かつ安定的に活性化された主にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を増殖・培養し、これを従来の免疫療法である養子免疫療法（adoptive therapy）として使用する事によって、従来のガン治療が無効なガン患者に対しての新しい治療法として役立つようにするものである。

【課題を解決する上での手段】本発明の培養方法は、ウシ細胞にB7遺伝子を発現させたものと、末梢血に由来

するリンパ球と免疫能賦活物質を色々な比率で共存させて培養することで、簡単にかつ安定的にCD3細胞傷害活性が高い、主にNK細胞及びCD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を増殖・培養することを持徴とする。

【0006】すなわち、末梢血から分離直後のリンパ球と、ガン細胞にB7遺伝子を導入・発現させたものを、共存させて培養し、特にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を増殖することを特徴とするリンパ球細胞の体外培養法である。

【0007】また、ガン細胞の傷害を容易にする免疫能の賦活物質で活性化したリンパ球と、ガン細胞にB7遺伝子を導入・発現させたりを、共存させて培養し、主にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を増殖することを特徴とするリンパ球細胞の体外培養法である。

【0008】上記2つの培養方法で増殖・培養した主にNK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を主剤とするがん治療薬である

【０００９】ここで、免疫能の賦活物質が各種サイトカイン、各種生体応答修飾物質（ＢＲＭ）、各種漢方生薬、または各種食品に含まれる有用物質、または細胞内マシナリーに影響を与える微量金属の中から選ばれた１種又は２種以上の混合物であり、かつ、ガン細胞傷害活性を高める物質を添加してガン細胞傷害活性を高めることができる。

【 0 0 1 0 】 本発明で使用する B 7 遺伝子を発現させたガン細胞は、ウイルスベクターを用いた方法、りん酸カルシウム法、リポソーム法、電気穿孔法など生物学の遺伝子導入法の中で既知の手段により作成し、これを増殖・培養して使用する。

【0011】ここで用いる各種サイトカインには、IL-1~18、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、G-CSF、M-CSF、GM-CSFなどがある。

【0012】各種生体応答修飾物質(BRM)には、OK-432(シシノハニール、中外製薬登録商標)、シズフィラン(ゾニフィラン、科研製薬登録商標)、ウリナフタチン(ミラクルリット、持田製薬登録商標)、レニチニン、丸山ワクチンなどがある。

【0013】また、各種漢方生薬には、以下に示す各種生薬、生薬わら、威靈仙、茵▲陳▼蒿、茴香、延胡索、黄耆、黄▲全▼、黄柏、黄连、遠志、薤白、艾葉、何首烏、葛根、滑石、括楼根、括楼仁、乾姜、甘草、桔梗、菊花、枳实、羌活、杏仁、苦苣、前芥、桂枝、红花、梗米、香附子、厚朴、牛膝、吳茱萸、牛蒡子、胡麻、五味子、柴胡、細辛、山梔子、山茱萸、酸枣仁、山藥、紫蘇葉、▲疾▼藜子、芍藥、車前子、縮砂、生姜、小麦、升麻、蜀椒、辛夷、神曲、石膏、川▲芎▼、蒼朮、桑白皮、大黃、大棗、沢瀉、地黃、竹茹、地骨皮、知母、釣藤、猪苓、陳皮、天麻、冬瓜子、当归、桃仁、独活、人參、麦門冬、薄荷、半夏、白▲芷▼、白朮、檳榔子、茯苓、修治附子、防己、防風、

僕▲東▼、牡丹皮、牡蛎、麻黄、麻子仁、木香、木通、▲意▼  
苡仁、竜骨、竜胆、良姜、連翹、連肉などがある。これらは  
単品又は混合したものも対象となり、市販の処方(方剤)  
としての麻黄湯、桂枝湯、大承気湯、白虎湯、大黃附子湯、  
四逆湯、小柴胡湯、梔子鼓湯、補中益気湯、六君子湯、十全  
大補湯、大参養榮湯なども賦活物質として評価の対象と  
なりうる。

【0014】更に、各種食品には、穀類・豆類の米、餅  
米、小麦、大麦、パスタ、そば、トウモロコシ、大豆、小豆、  
エンドウ豆、インゲン豆、芋やてんぷら類のほか、砂糖・  
甘味料、調味料、香料などの嗜好飲料類、油脂および乳  
類、種実類、魚介類、獣鳥鯨肉及び卵類、野菜類、果実  
類、きのこ類、海藻類など多種類にのぼる。これらのほ  
かビタミン類や健康食品としてよく知られているものとし  
てのAHC、アカリクス、キチンキトサン、ローヤル  
ゼリー、プロポリス、軟骨、もんこうの肝臓抽出物など  
が挙げられる。また、民間薬であるアマチャヅル、アロ  
エ、イカリソウ、枸杞葉、トクダミなどもここにいう食品  
に含まれる。

【0015】細胞内マシナリーに影響を与える微量元素  
としては、細胞に対して重要な生理作用を営むところ  
の、いわゆる無機塩類や灰分、鉱物質を形成する元素で  
あって、Ca、P、K、S、Na、Cl、Mg、Fe、Cu、Mn、I、Al、Zn、Se、  
Geなどである。

【0016】各種漢方生薬、各種食品などは一般には成  
分を損わない方法により乾燥したり、これを粉末化したり  
して水又は他の溶媒で抽出し、必要により濃縮した抽出  
液として用いる。

【0017】

【発明の実施の形態】以下実施例によって本発明の主に  
NK細胞・CD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団  
を増殖するリンパ球細胞の体外培養法及びがん治療薬の  
実施形態を詳細に説明するが、これらは膨大な資料の極  
く一部であり、実施例に限定されるものではない。

【0018】まず、第一ステップとしてがん細胞にB7  
遺伝子を発現させるプロトコルについて説明する。B7  
遺伝子をネオマイシン、ハイグロマイシンに対する薬剤  
耐性遺伝子が組み込まれた発現ベクターにつなぎ、作成  
した溶液と目的の細胞を混ぜ電気穿孔法によって遺伝子\*

\*を導入する。その後ネオマイシン、ハイグロマイシンな  
どの薬剤を添加し、目的の遺伝子が導入された細胞以外  
の細胞を死滅させ、目的の遺伝子を発現している細胞の  
割合を増やす。その後、限界希釈法を用いて増殖・培養  
したものを米国ベクトン・ディッキンソン社のFACS  
などの細胞表面解析装置を用いてB7抗原の発現を確認  
したものを増殖・培養して使用する。これをフィーダー  
細胞という。

【0019】次に、エフェクターであるリンパ球分離  
プロトコルについて説明する。血から採取した血液を遠  
心管に入れ、リン酸緩衝液(PBS)にて2倍に希釈  
し、複数の血液分離用のリンゴサプレツプチューブに移  
し、常温で遠心分離し、リンパ球を遠心管に採取し、P  
BSで洗浄し、遠心分離して上清を捨てる。この操作を  
3回繰り返した後、低温で更に2回PBSで洗浄し、培  
養液のRPMIを加えて濃度を測定し、リンパ球が4×  
10<sup>6</sup>個/mlとなるように濃度を調整した。この濃度  
測定は血球計算板を使用して行い、できるだけ正確に測  
定してリンパ球培養原液とした。これら調整された液を  
リンパ球培養調整液という。ここまでの操作は従来から  
類似の方法でリンパ球培地が調整されており、その方法  
をアレンジしたまでである。

【0020】本発明の特徴は、以上のようにして得られ  
た、リンパ球培養調整液とフィーダー細胞を一定の比率  
で混合して、更に各種免疫能の賦活物質を添加処理して  
新規なリンパ球培地とすることにある。すなわち、上述  
のリンパ球培養調整液をフラスコに5mlずつ分注す  
る。

【0021】次に、第二ステップとしてフィーダー細胞  
を2×10<sup>6</sup>個/mlになるようにリンパ球培養調整液  
を分注したフラスコに加える。

【0022】続いて、このフラスコに表1に示す多くの  
リンパ球賦活物質をそれぞれ適当な濃度で添加し、CO  
2インキュベーターへ格納し、1週間培養する。さら  
に、このリンパ球培地を生理食塩水等で洗浄して、点滴  
パックに詰めたものを採血した患者に対して投与する。

【0023】

【表1】

試料 No.	リンパ球賦活物質	
	種 類	物質名
0	RPMI	
1	サイトカイン	インターロイキン(IL-2), 175JRU
2	BRM 各種生体応答 調節物質	OK432(ビシバニール, 中外製薬登録商標) 0.1KE
3	漢方生薬	小柴胡湯, 補中益気湯, 六君子湯, 十全大補湯 人參養榮湯 すべて濃度は0.1%
4	(補麻)食品に含まれる 有用物質	AHCC(キノコの活性ヘミセルロース組成物) キチンキトサン アガリクス, ビタミンC
5	微量元素 (細胞内マシナリー)	Al, Zn, Se, Mn
6	抗ガン剤	マイトマイシンC

【0024】ここで処理したリンパ球を、本発明者らが先に提案している特願9-342675号記載の方法で検査した結果は表2のようになり、ガン細胞に対する傷害活性能力が9倍に増強できる事を示している。

【0025】この検査方法の概要を説明すると、次のようになる。すなわち、末梢血由来のリンパ球を分離して\*

\*培養液を含むリンパ球培地とし、1昼夜培養装置で培養したものをエフェクターとし、ユーロビウムで標識されたK562をターゲットとして細胞外に放出されたユーロビウムを蛍光光度法で計測した

【0026】

【表2】

	比率	細胞傷害活性(%)
本方法適用前採血時リンパ球免疫能	40:1	10.5
	20:1	8.2
	10:1	4.8
	5:1	1.3

	比率	細胞傷害活性(%)
本方法適用後リンパ球免疫能	40:1	96.3
	20:1	80.5
	10:1	70.5
	5:1	55.8

【0027】表2の結果から明らかなように、本発明の培養方法で得られるガン治療薬はガン細胞にB7遺伝子を発現させたものと、末梢血に由来するリンパ球と免疫能賦活物質を色々な比率で共存させて培養することで、簡単かつ安定的にガン細胞傷害活性が高いNK細胞及びCD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を増殖・培養する効果が得られる

【0028】これを図示すれば、図1のようになり、培養後のリンパ球集団についてペクトン・ダブツキンソン社のFACSスキャナなどで測定した場合のようにNK細胞、CD4陽性T細胞がリンパ球細胞集団の中

※なるのである

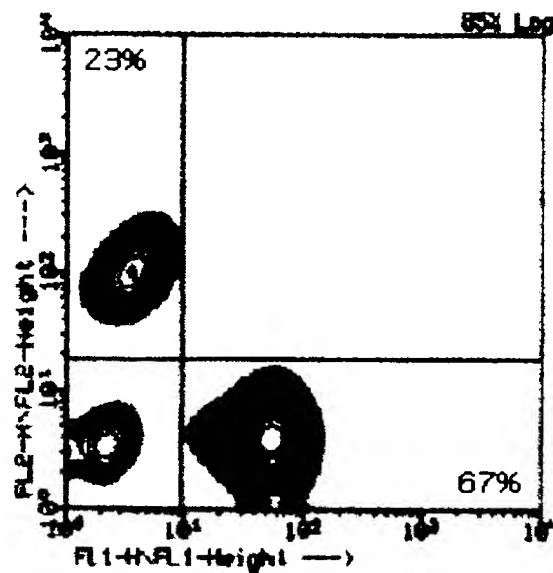
40 【0029】

【発明の効果】以上のように、本発明のB7遺伝子導入癌細胞を用いて、ヒト末梢血に由来するリンパ球細胞を体外で活性化、増殖、培養できる培養法を使用すると、養子免疫療法用のリンパ球として重要な役割を発揮するNK細胞及びT細胞を効率よく活性化・増殖させることができ、ガン治療薬として有用であることが判明した

【図面の簡単な説明】

【図1】CD4陽性細胞とNK細胞の関係を示す図である

【図1】



左上の分画は CD4 陽性 T 細胞

右下の分画は CD16 陽性 NK 細胞

左下の分画は CD16 陰性 NK 細胞と樹状細胞

フロントページの続き

(72)発明者 勅使河原 計介  
京都府京都市左京区松ヶ崎泉川町20-4  
(72)発明者 大久保 祐司  
京都府京都市下京区五条通柳馬場東入塩竈  
町384 ルネ河原町403

F ターム(参考) 4B065 AA92X AA94X AB01 CA44  
4C084 AA13 ZB262  
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 DA20  
ZB26